

令和 3 年 5 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23793

研究課題名（和文）尿酸の体内動態制御における新規尿酸輸送体の役割の解析

研究課題名（英文）Impact of a novel urate transporter on the regulation of the blood urate level.

研究代表者

宮田 大資（MIYATA, Hiroshi）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90844415

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、*in vitro*試験において新たに尿酸輸送活性が認められたGLUT12に着目し、遺伝子欠損マウスの作出及び生体レベルでの解析を行うことで、GLUT12が尿酸の体内動態制御において果たす役割を明らかにすることを目的に実施された。その結果、Glut12欠損マウスでは野生型マウスと比較して血中尿酸濃度が高値であることが明らかとなった。更なる研究の進展により、高尿酸血症の病態形成の理解や新たな治療戦略の開発へと繋がることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高尿酸血症は痛風の危険因子となる一方、尿酸は抗酸化作用を有する化合物であり、適切な血中尿酸濃度を維持することは临床上重要である。細胞膜を介した尿酸の輸送には輸送体の関与が必要であるものの、尿酸輸送体に関する理解は不十分であるのが現状である。本研究により生理的に重要な尿酸輸送体としてGLUT12が見出されたことは、尿酸の体内動態制御機構の理解という学術的興味のみならず、高尿酸血症や痛風の病態形成の理解といった臨床的観点での貢献も期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, the physiological function of novel urate transporter GLUT12 was investigated. For this purpose, Glut12 knockout mice were developed and urate levels were compared with wild type mice. As a result, plasma urate levels of Glut12 knockout mice were higher than those in wild type mice. This study provides insights into the deeper understanding of the urate regulatory system in the body, which is also important for pathophysiology of gout/hyperuricemia.

研究分野：医療薬学

キーワード：尿酸 トランスポーター 遺伝子欠損マウス CRISPR-Cas9 痛風 生活習慣病 GLUT12/SLC2A12

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血中尿酸濃度の異常は痛風に代表される様々な疾患と関連することが知られる。血中尿酸濃度制御因子の理解はこうした疾患に対する新たな治療戦略の提案につながるため、臨床的観点から重要である。尿酸は生理的条件下でアニオンとして存在するため、細胞膜透過過程を含む尿酸の体内動態制御には膜輸送体が必須であり、尿酸輸送体は血中尿酸濃度の規定因子となることが知られる。しかしながら、現在までに知られている尿酸輸送体のみでは尿酸の体内動態を説明できず、未知の尿酸輸送体の存在が想定されるものの、その分子実体は不明である。

そこで、研究代表者は、尿酸の体内動態制御機構の解明を目指し、尿酸の新規輸送体の探索を行ってきた。そのために、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) をはじめとした情報から候補遺伝子を選定し、一過性過剰発現細胞株を用いて尿酸輸送活性を評価した結果、GWAS により血中尿酸濃度との関連が指摘されていた GLUT12 が尿酸を基質とすることを新たに見出した。

### 2. 研究の目的

本研究は、血中尿酸濃度制御機構の理解に資するべく、研究代表者が新たに尿酸輸送活性を見出した GLUT12 が尿酸の体内動態制御において果たす役割を明らかにすることを目的に実施された。

### 3. 研究の方法

#### (1) GLUT12 の尿酸輸送特性の解析 (*in vitro*)

GLUT12 の尿酸輸送活性に影響を与える因子を明らかにするため、GLUT12 の一過性過剰発現細胞株による尿酸輸送活性を、様々な電解質および pH 条件のトランスポートバッファー中で測定した。尿酸輸送活性は放射性標識尿酸の取り込みを指標とした。

#### (2) 尿酸の体内動態制御における GLUT12 の役割の解析 (*in vivo*)

GLUT12 が尿酸の体内動態制御において果たす役割を明らかにするため、CRISPR-Cas9 系を用いてマウス受精卵において遺伝子改変操作を行うことで、*Glut12* 欠損マウスを作出した。この時、マウスはヒトとは異なり尿酸代謝酵素 (Uox) を有していることから、よりヒトに近いモデル動物とするため Uox ヘテロ欠損受精卵において遺伝子改変を行った。得られたマウスを交配させることで *Glut12-Uox* ダブルホモ欠損 (DKO) マウスとした後、血中および各臓器中の尿酸濃度を野生型マウスと比較した。各試料中の尿酸濃度は、UPLC-UV 系により測定した。

### 4. 研究成果

本研究の遂行を通し、以下の成果及び知見を得ることができた。

#### (1) GLUT12 は pH 依存的に尿酸を輸送する

GLUT12 と同一のファミリーに属する既知の尿酸輸送体である GLUT9 は電位依存的に尿酸を主に細胞内から細胞外へと輸送することが知られる。細胞内外の電位差を逆転させるため高カリウム濃度の培養液中でヒト GLUT12 による尿酸輸送活性を測定したところ、細胞外液と同様の電解質組成を有する培養液を用いた場合と比較して顕著な尿酸輸送活性の上昇は認められなかった。一方、培養液の pH を変動させて尿酸輸送活性を測定した結果、ヒト GLUT12 による尿酸輸送活性は低 pH 条件においてより高いことが明らかとなった。同様の傾向はマウス *Glut12* においても認められ、種差の影響は小さいと考えられた。

#### (2) *Glut12-Uox* DKO マウスの作出

CRISPR-Cas9 系を用いた遺伝子改変操作により 2 系統の *Glut12-Uox* DKO マウスが得られた。これまでに *Glut12* 欠損マウス作出の報告はなかったが、得られたマウスは交配可能であった。得られたマウスと同じ変異を導入した変異型 *Glut12* の発現ベクターを作成し、一過性過剰発現細胞株による放射性標識尿酸の取り込みを測定した結果、変異型 *Glut12* では尿酸輸送活性が喪失していることが確かめられた。このことより、得られた *Glut12-Uox* DKO マウスでは *Glut12* の機能が消失していると考えられた。

#### (3) *Glut12-Uox* DKO マウスでは血中尿酸濃度が高値である

*Glut12-Uox* DKO マウス及び野生型マウスより血漿を採取し UPLC-UV 系を用いて尿酸濃度を測定した結果、*Glut12-Uox* DKO マウスでは野生型マウスと比較して血中尿酸濃度が有意に高値であった。血中尿酸濃度の制御メカニズムを明らかにするため、血漿中及び尿中尿酸濃度、血漿中及び尿中クレアチニン濃度より尿中尿酸排泄率を算出したところ、尿中への尿酸の排泄には両群間で有意な差は認められなかった。一方、尿酸の主な産生臓器である肝臓中の尿酸濃度を各群間で比較した結果、*Glut12-Uox* DKO マウスでは野生型マウスと比較して低値である傾向が認められた。肝臓-血液間の尿酸移行の指標となる肝臓/血中尿酸濃度比は *Glut12-Uox* DKO マウスにおいて有意に低値であり、*Glut12* は血液から肝臓への尿酸の移行に関与している可能

性が考えられた。

ヒトにおいて、*GLUT12* 遺伝子近傍の遺伝子多型が血中尿酸濃度と関連することが報告されていることと併せて考えると、本研究の結果は *GLUT12* がヒトにおいても血中尿酸濃度の規定因子として生理的に重要である可能性を示唆しているものと考えられる。今後の研究の進展により *GLUT12* による尿酸動態制御の詳細なメカニズムが明らかになれば、高尿酸血症に対する新たな治療戦略の提案につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

|  |                             |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Toyoda Yu, Takada Tappei, Miyata Hiroshi, Matsuo Hirotaka, Kassai Hidetoshi, Nakao Kazuki, Nakatochi Masahiro, Kawamura Yusuke, Shimizu Seiko, Shinomiya Nariyoshi, Ichida Kimiyoshi, Hosoyamada Makoto, Aiba Atsu, Suzuki Hiroshi | 4. 巻<br>117                 |
| 2. 論文標題<br>Identification of GLUT12/SLC2A12 as a urate transporter that regulates the blood urate level in hyperuricemia model mice  | 5. 発行年<br>2020年             |
| 3. 雑誌名<br>Proceedings of the National Academy of Sciences  | 6. 最初と最後の頁<br>18175 ~ 18177 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1073/pnas.2006958117  | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)  | 国際共著<br>-                   |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Saito Hiroki, Toyoda Yu, Takada Tappei, Hirata Hiroshi, Ota-Kontani Ami, Miyata Hiroshi, Kobayashi Naoyuki, Tsuchiya Youichi, Suzuki Hiroshi | 4. 巻<br>12                |
| 2. 論文標題<br>Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Inhibit the Function of Human URAT1, a Renal Urate Re-Absorber  | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Nutrients  | 6. 最初と最後の頁<br>1601 ~ 1601 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/nu12061601   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)  | 国際共著<br>-                 |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件／うち国際学会 3件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takada Tappei, Toyoda Yu, Miyata Hiroshi, Matsuo Hirotaka, Ichida Kimiyoshi, Suzuki Hiroshi                              |
| 2. 発表標題<br>ABCG2, a physiologically and pharmacologically important exporter in humans  |
| 3. 学会等名<br>8th FEBS Special Meeting: ABC Proteins : From Multidrug Resistance to Genetic Disease, Innsbruck, Austria. (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>高田龍平、宮田大資、豊田優、山梨義英、山本武人、鈴木洋史 |
| 2. 発表標題<br>腸管・腎尿管の尿酸輸送と高尿酸血症            |
| 3. 学会等名<br>第50回日本消化吸収学会総会 羽田            |
| 4. 発表年<br>2019年                         |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高田龍平、宮田大資、豊田優、山梨義英、山本武人、鈴木洋史              |
| 2. 発表標題<br>尿酸排出トランスポーターABCG2に関する生理学的・薬理学的研究          |
| 3. 学会等名<br>生理研研究会『上皮膜・間質の機能連関と病態発現機構解明のためのストラテジー』 岡崎 |
| 4. 発表年<br>2019年                                      |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>宮田 大資、高田 龍平、豊田 優、鈴木 洋史            |
| 2. 発表標題<br>GLUT12/SLC2A12は血清尿酸値を制御する尿酸輸送体である |
| 3. 学会等名<br>第5回トランスポーター研究会関東部会                |
| 4. 発表年<br>2020年                              |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takada Tappei, Toyoda Yu, Miyata Hiroshi, Satsu Hideo, Matsuo Hirotaka, Ichida Kimiyoshi, Suzuki Hiroshi |
| 2. 発表標題<br>Functional Cooperation of Physiological Urate Transporters and Their Modification by Food Components     |
| 3. 学会等名<br>JAACT2020 Fuchu (招待講演) (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yamamoto Takehito, Takada Tappei, Tan Jeng Kae, Miyata Hiroshi, Yamanashi Yoshihide, Toyoda Yu, Suzuki Hiroshi                  |
| 2. 発表標題<br>ABCG2 is a physiological exporter of indoxyl sulfate, and its dysfunction accelerates the progression of chronic kidney disease |
| 3. 学会等名<br>FIP PSWC 2020 (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高田龍平、宮田大資、豊田優、鈴木洋史                  |
| 2. 発表標題<br>ゲノム解析により見出された尿酸トランスポーターと尿酸降下薬に関する研究 |
| 3. 学会等名<br>第30回日本医療薬学会年会                       |
| 4. 発表年<br>2020年                                |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|